

(C) NPI / Thomson

AN - 1888-389332 (33)

AP - JPI9970336516 19971119

CFY - SAKA

DC - B03

DW - 199933

IC - ASIK-031/495; C07D-215/22

INNKA - 1995-114894

M2 - (01) D012 D013 D021 D022 D622 F011 F014 F553 G001 G011 G012 G013 G014  
G015 G016 G100 H1 H121 H141 H3 H281 H211 H5 H541 H542 H8 J0 J011 J3  
J381 J5 J521 L9 L941 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222  
M223 M224 M225 M226 M231 M232 M233 M272 M281 M282 M320 M312 M511 M521  
M531 M540 M710 M903 M904 P522 P631 P714 P721 P723; 9913-ACT01-N  
9903-ACT01-T

MC - B06-C02 B07-D11 B14-D01 B14-F01 B14-N01 B14-X10

PA - (SAKA ) OTSUKA PHARM CO LTD

PN - JPI11152338 A 19980508 DW199923

PR - JPI9970336516 19971119

XIC - ASIK-031/495; C07D-215/22

AB - TSC-22 inducers contain piperazineyl carbostyryl compounds of formula (I). R = benzoyl having lower alkoxy on the phenyl ring. (I) is particularly vassaraxone (i.e. (I; R = 3,4-dimethoxybenzoyl at C6 position, and optional bond is absent)).

- USE :

For prevention and treatment of osteoporosis, endocrine diseases, cardiac and renal diseases caused by water retention, including cardiac failure at doses of 0.5-30 mg/kg/day up to 4 divided doses.

For predicting and prevention of blood, liver or spleen toxicity.

TM - INDUCE TREAT OSTEOFOROSIS ENDOCRINE DISEASE CARDIAC RENAL CAUSE WATER RETAIN

IWW - INDUCE TREAT OSTEOFOROSIS ENDOCRINE DISEASE CARDIAC RENAL CAUSE WATER RETAIN

NC - 1

NPM - 1

OPD - 1997-11-19

PAM - (SAKA ) OTSUKA PHARM CO LTD

PD - 1998-06-08

TI - TSC-22 inducers - for treating e.g. osteoporosis, endocrine diseases, cardiac and renal diseases caused by water retention

(10) 日本国特許庁 (JP)

(11) 公開特許公報 (A)

(12) 特許出願公開番号

特開平11-152228

(13) 公開日 平成11年(1999)6月2日

(14) Int.Cl.<sup>\*</sup>  
A 61 K 31/499

識別記号  
AED  
ABJ  
ABN  
ACV  
ADT

F I  
A 61 K 31/496  
AED  
ABJ  
ABN  
ACV  
ADT

審査請求 未請求 検索項目の数 3 ページ (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-336516

(71) 出願人 00026636

大冢製薬株式会社  
東京都千代田区神田須町2丁目9番地

(22) 出願日 平成9年(1997)11月19日

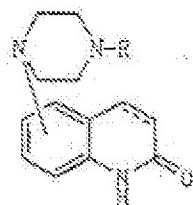
(72) 発明者 川又 勇  
徳島県徳島市南佐古六条町6-12 ライオ  
ンズマンション徳島南佐古703  
(73) 発明者 佐藤 光信  
徳島県徳島市八万町下越万187-10  
(74) 代理人 弁理士 三枝 美二 (外10名)

(54) 【発明の名称】 TSC-23誘導剤

(57) 【要約】

【構成】 本発明は、一般式

【化1】



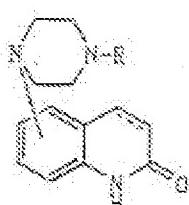
〔式中、Rは、フェニル環上に低級アルキル基を有することのあるベンゾイル基を示す。カルボスチリル骨格の3位と4位との炭素間結合は、一塗結合又は二塗結合を示す。〕で表わされるカルボスチリル誘導体又はその塩を有効成分とするTSC-23誘導剤を提供する。

【効果】 本発明TSC-23誘導剤は、鎮痛作用に基づき骨粗鬆症を始めとする骨形成不全症の治療、心疾患、骨疾患の治療に有用である。

卷之三

卷之三

3. 183. 3



〔式中、Rは、フェニル環上に置換基として直鎖アルキル基を有することのあるベンザイル基を示す。カルボスチリル骨格の3位と4位との接続部位は、一重結合又は二重結合を示す。〕で表されるカルボスチリル誘導体及びその誘導体から選ばれる少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とするTSC-221錠。

【請求項3】 カルボスチリル誘導体がもー〔4ー(3,4-ジメトキシベンゾイル)ー〕ービニラジニルー〔3,4-ジヒドロカルボスチリルである請求項1に記載のTSC-22誘導剤

2023 RELEASE UNDER E.O. 14176

100013

【発明の属する技術分野】本発明は、特定のカルボスチリル誘導体を有効成分とするTSC-22誘導剤に関するもの。本発明のTSC-22誘導剤は、TSC-22選択性の発現誘導作用を有することに基づいて、骨髄炎症を始めとする骨筋膜下室症、内分泌疾患あるいはそれに続発して起る水脳貯留による心疾患、腎疾患の治療に有用である。また、上記作用は、当該誘導剤の副作用としての無効粒状症の発症機構を解明するのに有用であり、その発症の予測あるいは予防法の開発においても有用である。

1000 ft

【従来の経験】 6- (4-(3,4-ジメトキシベンゾイル)-1-ビペラジニル)-3,4-ジヒドロカルボスチリル(以下、ベスナリノンともいう。)を始めとするカルボスチリル誘導体は、慢性的疾患の治療に用いられる経口変力剤(*oral inotropic agent*)として開発され(J. Am. Coll. Cardiol. 9: 865-871 (1987))、近年、ヒト唾液腺癌細胞株(human salivary gland cancer cell line; 以下、TYS細胞ともいう。; Am. J. Pathol. 124: 496-509 (1986))を含む幾つかの癌細胞に対して、インビオ及びインビトロで、抗増殖活性並びに分化-及びアポトーシス-誘導活性を有することが報告されている(Acta Histochem. Cytoches. 277: 391-399 (1999); Cancer Lett. 91: 1-9 (1995))。このため、日本では、該化合物を有効成分とする薬物が頭頸部の固形腫瘍に対する抗腫瘍剤として臨床試験に供されている。

[10003] 我々は、最近、TYS細胞をペスナリソンで処理することにより、TGF- $\beta$ 1 mRNA及びTGF-

1<sup>83</sup>I mRNA 並びにそれらの蛋白質が説明されることを報告している (Cancer Lett. 112: 181-189 (1997)).

100041

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ペスナリノン等のカルボスチリル誘導体の新たな作用、並びにその作用に基づく新規用途を提供することを目的とする。より具体的には、本発明はペスナリノン等のカルボスチリル誘導体又はそれらの他のTSC-22誘導剤としての新規用途を提供することを目的とする。

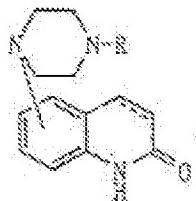
100031

【課題を解決するための手段】本発明者は、ペスナリノンを始めとする特定のカルボスチリル誘導体の新規用途を開拓すべく、継続研究を重ねていたところ、TYS細胞をペスナリノンで処理することによりTSC-22 mRNAの発現が増強されることを見出し、また誘導されたTSC-22が細胞の成長・増殖並びにCNP (C-type natriuretic peptide) を介したTGF $\beta$ やIFN- $\gamma$ 等のサイトカインの発現調節に至り、細胞内のシグナル伝達系の促進 (Eur. J. Biochem., 242, 490~496 (1996)) といった細胞作用及び細胞増殖の制御に重要な役割を果たしていることを見出した。本発明はこのような知見に基づくものである。

【0006】すなわち、本発明は下記一般式(1)で表わされるカルボスチリル誘導体及びその塩から選ばれる少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とするTSC-22清潔剤である。

300073

卷之三



63

また本発明は、上記カルボスチリル誘導体がらく（4-（3,4-ジメトキシベンゾイル）-1-ビペラジニル）-3,4-ジヒドロカルボスチリルである上記下記C-22誘導剤である。

【10008】本発明の説明書は、後記実験例に示すように、TGF- $\beta$ 1等のタンパクの産生を介して或はこれを介すことなく直接に、上記所置のTSC-22遺伝子の発現を誘導するものである。

【0009】TSC-22遺伝子は脳や心臓での発現が高く、腎臓や肝臓では発現が低く、末梢血では殆ど発現していないことが知られている。また当該遺伝子は、TGF- $\beta$ で骨芽細胞を処理した後直ちに誘導されること、またFSHなどのホルモンに応答して誘導されることが明らかにされている。更に、TSC-22は、Cタクイアナトリウム利尿ペプチド(CNP)のプロモーター

配列に結合し、その構造を直接説明することも知られている。

【0010】このため、本発明TBC-23誘導剤は、骨粗鬆症等の骨形成不全症、内分泌疾患、あるいはそれに連発しておこる水分貯留による心疾患、腎疾患等の各種疾患の治療、予防薬として有用である。また、本誘導剤を含む各種薬剤による血栓形成性、肝、腎毒性の発現の予測あるいは予防法の開発に有用となる。

【0011】

【発明の実施の形態】上記一般式(1)において示される各基は、より具体的にはそれぞれ次の通りである。即ち、既後アルコキシ基としては、例えばメトキシ、エトキシ、アロボキシ、イソアロボキシ、グトキシ、tert-ブロトキシ、ベクチルオキシ、ヘキシルオキシ基等の炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状アルコキシ基を例示できる。

【0012】フェニル環上に置換基として紙級アルコキシ基を有するとのあるペニソイル基としては、例えばベンゾイル、2-メトキシベンゾイル、3-メトキシベンゾイル、4-メトキシベンゾイル、2-エトキシベンゾイル、3-エトキシベンゾイル、4-エトキシベンゾイル、3-イソアロボキシベンゾイル、4-ブロトキシベンゾイル、2-ベンチルオキシベンゾイル、3-ヘキシルオキシベンゾイル、3,4-ジメトキシベンゾイル、2,5-ジメトキシベンゾイル、3,4-ラートリメトキシベンゾイル基等のフェニル環上に置換基として炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状アルコキシ基を1～3個有することのあるベンゾイル基を例示できる。

【0013】本発明において有効成分とする上記カルボスチリル誘導体等特に珍らしいものとしては、例えば6-(4-(3,4-ジメトキシベンゾイル)-1-ビペラジニル)～1,4-ジヒドロカルボスチリル(「ペスナリソン」)を例示できる。

【0014】上記カルボスチリル誘導体の他には、通常の酸を用いて形成される薬理学的に許容される酰封加塗が包含される。該塗を形成する酸性化合物としては、具体的には例えば琥珀酸、リン酸、硫酸、草酸、無水次亜酸等の無機酸、酇酸、丙酸、マレイン酸、フマル酸、リノン酸、酇石酸、クエン酸、コハク酸、エタンスルホン酸、2-トルエンスルホン酸、安息香酸等の有機酸を例示することができる。

【0015】なお、一般式(1)で表されるカルボスチリル誘導体及びその塗は、例えば特公平1-43747号公報に記載される製法に従って製造することができる。

【0016】本発明の誘導剤の有効成分である一般式(1)のカルボスチリル誘導体又はその塗は、通常、一般的な医薬製剤の形態で用いられる、かかる製剤は、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、潤滑剤等の希釈剤乃至賦形剤を用いて

調製される。この医薬製剤としては各種の形態が治療目的に応じて選択できる。その代表的なものとしては錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤(散剤、懸濁剤等)等を例示できる。

【0017】錠剤の形態に成形するに際しては、粗体としてこの分野で從来公知のものを広く使用でき、例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、水、エタノール、プロパンノール、單シロップ、ブドウ糖液、デンブン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンチン液、ラミナラン液、炭酸カルシウム、糊酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバター、小糸素加塗等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塗基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントサイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製グリセラク、ステアリン酸塗、ホウ酸塗、ホリエチレングリコール等の滑沢剤等が例示できる。更に統剤が必要に応じ通常の削皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶錠、フィルムコーティング錠に調製することもできるし、また二重錠、多層錠とすることもできる。

【0018】丸剤の形態に成形するに際しては、粗体としてこの分野で從来公知のものを広く使用でき、例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、塩化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム液、トラガント液、ゼラチン、エタノール等の結合剤、ラミナランカンテン等の崩壊剤等が例示できる。

【0019】坐剤の形態に成形するに際しては、粗体として從来公知のものを広く使用でき、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセライド等を挙げることができる。

【0020】注射剤として調製される場合には、液剤及び懸濁剤は吸収され、且つ血漿と等張であるのが好ましく、これら液剤、乳剤及び懸濁剤の形態に成形するに際しては、希釈剤としてこの分野において慣用されているものを全て使用でき、例えば水、エチルアルコール、ブロビレンジリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げることができる。尚、この場合等張性の溶液を調製するに充分な量の食塩、ブドウ糖、グリセリン等を医薬製剤中に含有させてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無発泡剤等を添加してもよい。

【0021】更に本発明の医薬剤の中には、必要に応じ

て着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等他の医薬品を含有させててもよい。

【0022】本発明の調導剤中に有効成分として含まれる式(1)で示されるカルボスチリル誘導体又はその塩の量は、特に限定されず適量より適宜選択されるが、通常全組成物中約1~70重量%、好ましくは約1~30重量%程度の範囲とするのが適當である。

【0023】かくして得られる本発明の調導剤の投与方法は特に制限ではなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、その他の条件、疾患の程度に応じて決定される。例えば、注射剤形態の医薬製剤として調製した場合には、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内投与等により投与され得る。これは必要に応じてブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与することもできる。錠剤、丸剤、顆粒剤、カプセル剤等の固形形態や経口投与

ペスナリノン

デンアン

マグネシウムステアレート

乳糖

計

1袋中、上記組成物を含有する錠剤を製造した。

【0027】

ペスナリノン

アビセル(商標名、旭化成株式会社製)

コーンスター

ステアリン酸マグネシウム

ヒドロキシプロピルメチルセルロース

ポリエチレングリコール-6000

ヒマシ油

メタノール

上記有効成分化合物、アビセル、コーンスター及びステアリン酸マグネシウムを混合研磨後、糖衣R 1.0 mm のキメで打継する。得られた錠剤をヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリエチレングリコール-6000、ヒマシ油及びメタノールからなるフィルムコーティ

ペスナリノン

クエン酸

ラクトース

リン酸二カルシウム

ブルコニッカドー68

ラウリル硫酸ナトリウム

ポリビニルビロリドン

ポリエチレングリコール(カルボマックス)500

ポリエチレングリコール(カルボマックス)6000

スーンスター

乾燥ラウリル硫酸ナトリウム

乾燥スタアリン酸マグネシウム

エタノール

上記有効成分化合物、クエン酸、ラクトース、リン酸二カルシウム、ブルコニッカドー68及びラウリル硫酸ナ

用成形剤の選択剤とする場合は、経口又は経腸投与され得る。また塗剤は直腸内投与である。

【0024】本発明の調導剤の投与量は、皮膚から適宜選択でき、特に限定されるものではないが、通常一般式(1)のカルボスチリル誘導体又はその塩が、一日当たり体重1kg当たり約0.1~3.0mg程度の範囲から選択される量とされるのがよく、また投与単位形態中にこれらの有効成分が約1.0~1.000mgを含有されるのが適當である。また本発明のTSC-2調導剤の投与は、一日1回又は一日3~4回に分けることもある。

【0025】

【実施例】以下、本発明を更に詳しく説明するため製剤例及び実験例を示す。

【0026】

【製剤例1】

ペスナリノン	15.0 g
デンアン	13.2 mg
マグネシウムステアレート	1.8 mg
乳糖	4.5 mg
計	20.0 mg

【製剤例2】

ペスナリノン	15.0 g
アビセル(商標名、旭化成株式会社製)	4.0 g
コーンスター	3.0 g
ステアリン酸マグネシウム	2 g
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	1.0 g
ポリエチレングリコール-6000	3 g
ヒマシ油	4.0 g
メタノール	4.0 g

上記有効成分化合物、アビセル、コーンスター及びステアリン酸マグネシウムを混合研磨後、糖衣R 1.0 mm のキメで打継する。得られた錠剤をヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリエチレングリコール-6000、ヒマシ油及びメタノールからなるフィルムコーティング剤で被覆を行ない、フィルムコーティング錠を製造する。

【0028】

【製剤例3】

ペスナリノン	15.0, 0 g
クエン酸	1.0 g
ラクトース	3.3, 5 g
リン酸二カルシウム	7.0, 0 g
ブルコニッカドー68	30, 0 g
ラウリル硫酸ナトリウム	15, 0 g
ポリビニルビロリドン	15, 0 g
ポリエチレングリコール(カルボマックス)500	4, 5 g
ポリエチレングリコール(カルボマックス)6000	45, 0 g
スーンスター	30, 0 g
乾燥ラウリル硫酸ナトリウム	3, 0 g
乾燥スタアリン酸マグネシウム	3, 0 g
エタノール	適量

上記有効成分化合物、クエン酸、ラクトース、リン酸二カルシウム、ブルコニッカドー68及びラウリル硫酸ナ

トリウムを混合する。

【0029】上記混合物をN6, 60スクリーンにて篩

剥し、ポリビニルビロリドン、カルボフックス1500及びカルボフックス6000を含むアルコール性溶液で繊維純化する。必要に応じてアルコールを添加し、粉末をペースト状塊にする。コーンスタークを追加し、均一な粒子が形成されるまで混合を続ける。No. 10スクリーンを通して。トレイに入れ、100°Cのオーブンで12~14時間乾燥する。乾燥粒子をNo. 16スクリーンで分別し、乾燥ラウリル硫酸ナトリウム及び乾燥ステアリン酸マグネシウムを加え、混合し、打鍛機で所要の形状に圧縮成形する。

【0030】上記芯部をワニスで処理し、タルクを散布して湿気の吸収を防止する。芯部の周囲に下述り膠を被覆する。内側用のために充分な量のワニス被覆を行なう。絶縁を完全に丸く且つ滑らかにするために、更に下述り膠及び平滑被覆を適用する。隔壁の結合が得られるまで着色被覆を行なう。乾燥後、被覆剤を磨いて均一な光沢の絶縁を調整する。

0031

【実験例】以下に記載する実験例で使用するバスクナリソン及びTYS細胞の調製、並びに実験例で用いた種々の操作は、次の方法に従って行った。

[0032] (1) ベスナリンの説

ペスナリノンは、すみジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて10 mg/m1濃度のストック溶液として調製しておいた。該ストック溶液中のペスナリノンの拡増活性は、4で少なくとも1ヶ月間安定であった。使用する前に完全培地で希釈して、所望濃度に調製して用いた。

【0033】(2) TY6細胞の調製及び培養:ヒト唾液腺扁平上皮癌細胞TY6 (Am. J. Pathol., 124, 495-509 (1986))は、1.0%仔ウシ血清(FCS; BioWhittaker), 1000 μg/mlストレプトマイシン, 100U/mlペニシリン(Gibco Lab.)及び0.25μg/mlアンホテリシンB(Gibco Lab.)を添加したダルベッコ改良イーグル培地(DME; Gibco Lab.)を用いて、95%酸素及び5%CO<sub>2</sub>存在下。温湿度気下において37℃で培養することにより、調製した。

## [10034] (3) ポリメラーゼキーチンリアクション (PCR)

PCRは、反応液中の最終dNTPs濃度及び最終プライマー濃度をそれぞれ200 μM及び1 μMとし、該反応液にTaq DNAポリメラーゼ(Takara)を最終濃度が0.05 U/μlとなるように加えて、サーマルシーカンサー(IaskiGlass)を用いて行った(94°C 3分、94°C 1分、59°C 1.5分、72°C 2.5分の30サイクルと72°C 4分の延長)。

#### (4) マーキングプロット技術

細胞質 RNA ( $20 \mu\text{g}$ ) を、ホルムアルデヒド/ $1\%$  アガロースゲルにて電気泳動し、これをサイロンフィルター (Hybond- $\text{N}^+$ ; Amersham) にプロットした。この

ナイロンフィルターを、50%ホルムアミド、5%生理食塩-リン酸ナトリウム-EDTA (saline-sodium phosphate-EDTA) -0.1%SDS、5%デンハルト (Denhardt's) 液及び100μg/mlサクシニスDNA溶液下に、42°C、15~20時間、<sup>32</sup>P標識cDNAプローブとハイブリダイゼーションを行った。0.1%SC (standard saline citrate)-0.5%SDSにて、室温で2回及び50°C40分間にて1回、十分に洗浄した。X線フィルムへの露光は、暗撲スクリーンを用いて7日間で行った。

[9035] 使用したプローブは、ヒトTSC-2 cDNAの3'末端(1.2 kb)、TY3S組細よりクローニングした完全なオープンリーディングフレームを有するヒトp21\*\*\*cDNAのS75 bpフラグメント(Cancer Lett. 112: 181-189 (1997))及びヒトターアクチニンpHF6A-1 (AKR R07764; NIBRG46)のXbaI-1-NheI 1 フラグメント(2.1 kb)である。

【0036】シグナルのデシントストリック解析は、N1Hイメージ1、44プログラム及び/又はBAS-20.00IIイメージ解析システム(Fuji photo file)によって行なった。

## 【0037】実験例1、イタビトコ細胞培養に対するベヌカリノンの影響

TY-S細胞のインピットロ培養に対するペスナリノンの影響（抗増殖作用）を、MTTアッセイ法 (3-(4,5-ジメチル-チアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド) (Cancer Res. 47: 936-942 (1987)) を用いて評価した。

【10038】具体的には、96ウェルプレート (Falcon; Becton Dickinson Labware) の 10% FCS を含む DMEM 中に、TYS 細胞を  $2 \times 10^5$  細胞 / ウェルとなるようまいだ。24 時間後、細胞を、種々の濃度のペスティリノン (0, 0.1, 1, 10, 50 μg/mL) を含む DMEM (10% FCS 含有) 培地中に移し、2~4 日後、MTT (Sigma) を用いたアッセイにて細胞数を定量した。

【0039】結果を図1に示す。これから分かるように、ペスナリノンは0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ～ 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度ではTYS細胞の増殖を殆ど抑制しなかったが、5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度では著しく抑制した。ペスナリノンのTYS細胞に対する増殖阻害活性は、細胞静止性であるが細胞致死性ではなかった。5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のペスナリノンで処理したTYS細胞は拡大し細胞分裂が停止しながら、培養皿の底から剥離しなかつた。

【0040】また、ペスナリノン製剤用溶媒として用いたDMSOの抗増殖作用を確認した。結果、DMSOは確かにTYS細胞の増殖を阻害したもので、ペスナリノンの抗増殖作用に比較してその程度は非常に低かった。

100411 第2章：细胞周期控制

TY5細胞を、ペニシリノン（50**μ**g/ml）の存在

又は非存在下で、24時間、48時間及び72時間培養した後、コニカルチューブ(Falcon)に集め、該細胞を70%エタノールで固定して、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。100 μg/m l の RNase A (Sigma) で處理後、細胞を40 μg/m l の propidium iodide(Sigma probe)で染色し、次いで細胞周期をデジタルフローサイトメトリーシステムFCM3 ( Coulter ) で解析した。

【0042】ベスカリソン未選択群のうち50%のTYも細胞が、着地を換えた後2-4時間では粗及びG2/第3期を示した。しかししながら、4名時間及び7-2時間後に

は、これらの期を示す細胞の割合は徐々に減少した(図2及び表1)。これはおそらく、培地中の成長因子の消耗及び／又は接觸阻害による増殖抑制に起因するものと考えられる。一方、ペスナリノン処理群では、東洋燃機24時間でS相及びG2/M相を示す細胞の割合は、上記未処理群よりも非常に少なかった(図2及び表1)。ペスナリノンで48時間以上曝すると、殆どのT-YS細胞はG1期で停止した(図2及び表1)。

10043

三

	未處理 TYS 滴點			處理 TYS 滴點		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
60/01	66.5%	66.5%	72.7%	76.2%	81.6%	92.9%
S	24.6%	17.6%	11.1%	18.3%	7.2%	2.0%
63/8	26.3%	21.7%	18.3%	11.0%	8.4%	4.7%

これらのことから、ペスカリノン送致とアレストを説明することによって細胞培養を抑制することがわかった。

{0044} 頭脳3. ヒトTSC-22cDNAの組

ペスナリノンで処理したTYS細胞から構築したcDNAライブラリーからペスナリノン誘導遺伝子としてT S C-22 cDNAを単離した。具体的には、次の方針により行った。

卷之四

TYS細胞をペスナリノン(40μg/ml)で3日間処理した。次いで、得られた細胞をSindet p-40 (Sigma) を含む低濃度緩衝液により溶解し、核(nuclei)を除去して、後細胞質RNAを調製した。該該細胞質RNAについてオリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィーを2サイクル行うことにより、Poly(A)<sup>+</sup>RNAを調製した。

#### 【参考文献】(2) cDNAライブラリーの構成

得られたPoly(A)<sup>+</sup> RNA 5 μgをオリゴ(dT)-XbaIプライマー／リンカー(Stratagene)を用いたM-MLV(Gibco)によって逆転写した。セカンドストランドcDNAを、cDNA合成キット(Stratagene)を用いて合成し、該キットの引物に従ってEco RIアダプターをライゲートした。該合成cDNAをXba Iで切断後、予めEco RIとSal Iで消化したおいたクローニングベクターZAP Express (Stratagene)にライゲートした。該cDNAは、ベクター中の真核細胞及び原核細胞のプロモーターよりアンチセンスオリエンテーション(antisense orientation)に導入された、一次cDNAライブライリーは、約 $1.5 \times 10^4$ クローンを含んでおり、90%が細胞体であった。ZAP Expressライブライリーは1回増殖後に用いた。

[0047] (3) ランダムシーケンシング

ペスチリノン処理TYS細胞から精製した上澄とDNAライブラリーからランダムに10<sup>7</sup>個のクローンをシーケンスした。

【10048】具体的には、ラシダムに選択したpBRK-  
CMV-ライブリリーー形質転換コロニーを爪鶲枝で捨  
て上げ、う〇.5×m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>のカナマイシンを含む6m<sup>3</sup>の  
LB培地にて継代培養した。ファージミドをアルカリテ  
ンス法により抽出し、該ファージミドの半分を更に  
R.IとP.s.t.1で消化して、cDNA挿入断片を切り出した。  
挿入断片の殆どは0.5～2kbのサイズ範囲であ  
った。該断片をアガロースゲルからGene Clean Kit I  
I (Bio 101) を用いて精製し、ノーザンプロット分析用  
のアボープトにて用いた。

【0049】残り半分のファージミドをシーケンシング分析に供した。 $\phi$ DNAの配列をP1 T7C標識プライマー及UTakara *Taq Cycle Sequencing Kit*新しくなったThermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham)を用いた、ジデオキシン鎖ターミネーション法により調べた。電気泳動とスキャニングを島津ISQ-200DNAシーケンサー(島津製作所)を用いて行った。約200～300塩基対のDNA配列が、各クローンに検出された。全ての核酸のホモロジーを、Gene BankまたはEMBLデータベースから、BLASTプログラムを用いてサーチした。

【10050】その結果、クローンの約64%が公知の遺伝子であり、18%がデータベースには記録されているものの機能的には不明な遺伝子であり、18%が未知の遺伝子であった。

[10051] 公報遺伝子において、ペスナリノン処理T<sub>VS</sub>ライブラリーのハウスキーピング遺伝子の割合は、普通に構築された（ペスナリノン未処理） $\lambda$ -DNAライブラリーのそれを比べて少なかった。このことから、ペ

ベスナリノン処理は、ハウスキーピング遺伝子の発現を低下させ、TYS細胞における細胞増殖、アホトーシス及び分化に関連する遺伝子の発現を相対的に増加させることがわかった。公知遺伝子の約30%（例えば、TSC-22、HSC70、CK19、SOS、NGFR関連リンパ球活性化分子、IL-6、TAFI1A、エロングーションファクター、IL-1/TNF誘導E-ST、DNA結合タンパク、アキシンII、DNA依存性蛋白キナーゼ複数サブユニット、m6-GDI、SULI経説開始因子、リソソーム防衛タンパク、TNF-α誘導タンパクB12、ADP-リボシレーショング子、ホスホリバーゼA2及び1.3kDa 分化関連タンパク等）が、細胞増殖、分化及びアホトーシスに関連しているようである。

【0052】また、ノーザンブロッティングを用いて、上記公知遺伝子及び未知遺伝子の発現を、ベスナリノン未処理TYS細胞とベスナリノン処理TYS細胞との間で比較した。その結果、ベスナリノン処理によりTSC-22 mRNAの発現が増加することが明らかとなつた。しかしながら、他の遺伝子の発現はTYS細胞のベスナリノン処理によって変化しないか、減少していた。

【0053】(4)ヒトTSC-22 cDNAの単離  
ラングムレークエンシングで得られたクローン（pBK-CMV-hTSC-22の3'末端）は、1313bpのヒトTSC-22 cDNAフラグメントだけを含み、完全なオーアンリーディングフレームを含んでいなかつたため、完全長のヒトTSC-22 cDNAをクローン化することを試みた。

---

プライマー DP1 : 5'-ageccagtttgcggatggccctggaa-3'  
DP2 : 5'-tgtggatgtggccctggaaactgggg-3'  
mUP : 5'-atctatgttccatccatccatca-3'

---

T7 RNAポリメラーゼプロモーター

本発明において種猪胚胎細胞から取得されたヒトTSC-22のスクレオチド配列は、ジョイ等によって最近ヒト胎兒(fetaly)から取得されたものと完全に一致した(Biochem. Biophys. Res. Commun. 222: 821-826 (1995))。タクシオチド配列分析によつて、ヒトTSC-22遺伝子は、マウス又はラットTSC-22遺伝子とにして79%のホモロジーがあることがわかつた。しかし、ヒトTSC-22のコードイング領域におけるタクシオチド配列は、マウスはラットTSC-22のそれと92%一致した。

【0059】一方、それから推定されるヒトTSC-22タンパクのアミノ酸配列は、マウス又はラットTSC-22タンパクのそれと98%一致した。マウス及びラットのTSC-22タンパクは143個のアミノ酸を含んでいるのに対して(Shibamura et al., J. Biol. Chem. 267: 10219-10224 (1992); Hasil and Rall, Endocrinology 134: 1205-1212 (1994))、ヒトTSC-22タンパクは144個のアミノ酸を含んでいた。また、ヒトTSC-22では、コドン4-3位にセリン残基が一箇挿入されており、マウス及びラットにおけるコドン1-4位のセリン残基(ヒトではコドン1-2位)がプロリン残基に置換されていた。また、ヒトTSC-22タンパクには、ロイシン-77～ロイシン-98の領域にロイシングッパー構造が保存されていた。

【0060】なお、TSC-22タンパクは、ロイシンジッパー構造を有するタンパクであり、TGF-β又はFSH誘導可逆性レギュレーターとして作用することが報告されている(TGF-β or FSH inducible putative transcriptional regulator)。

【0061】実験例4 TYS細胞のベスナリノン処理によるTSC-22 mRNA発現の検索

(1) TYS細胞をベスナリノンで処理することによつ

て説明されるTSC-2のmRNAの発現をノーザンブロット分析を用いて調べた。

【0062】具体的には、TYS細胞をベスナリノン（50 μg/ml DMEM）で処理し、次いで該TYS細胞から細胞質RNAを調製し、1%変性アガロースゲル上で電気泳動した。それをナイロンフィルターに転写し、ヒトTSC-22及びターアクチン用の<sup>32</sup>P-標識プローブにハイブリダイズし、オートラジオグラフィによりTSC-22 mRNAの発現状況を調べた。また、得られたオートラジオグラフをデンシトメトリック走査計で評価した。また、対照実験としてベスナリノン未処理のTYS細胞についても同様にTSC-22 mRNA発現を調べた。結果を図3に示す。

【0063】TYS細胞中に、約1.8kbのTSC-22mRNAが検出された。TYS細胞のTSC-22mRNAレベルは、細胞がコンフルエンスに達するまで持続的に増加した(図3)。TYS細胞中のTSC-22mRNA発現は、う〇mg/m<sup>2</sup>ペスチリノン処理によって著しく増加した(1日目:コントロールの225%、2日目:コントロールの164%、3日目:コントロールの125%) (図3、B)。また、TSC-22mRNAの発現はペスチリノン添加後、少なくとも3日間続いた。

【0064】(2) 次いで、ペスカリノン処理によるTSC-22 mRNAの誘導状況を経時的に追跡した。参考として、公知のTSC-22誘導因子であるトランスマッピング成長因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) を用いて同様に行なった。具体的には、1、2、6、12及び24時間の各時間にわたり TY S細胞をペスカリノン及びTGF- $\beta$ 1のそれぞれで処理し、得られたTY S細胞から細胞質RNAを調製し、mRNA (20nm/レーン) を1%変性アガロースゲルで電気泳動した。次いで、ナイロンフィルターに移し、ヒトTSC-22及びターアクチン用のcP-標識プローブにハイブリダイズしてオートラジオグラフィーに供した。得られたオートラジオグラフをデンシトメトリックス走査計で評価した。結果を図4に示す。

[0065] これからわかるように、短時間のペスナリソン処理ではTSC-2 mRNAはあまり説明されないが、24時間処理することによって急速にTSC-2 mRNA発現が増加した(図4, B)。一方、TGF- $\beta$ 1処理では、短時間の処理でTSC-2 mRNAが速やかに説明された(図4, B)。

[0066] (3) また、TSC-2 mRNA 発現誘導がベスナリノンの直接の効果であるか否かを明らかにするために、タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドで処理して、その遺伝子誘導に対する影響を調べた。また、参考として、ベスナリノンによって誘導される  $\beta$ -2.1 $\times$   $\beta$ 1 mRNA の発現に対するシクロヘキシミドの影響についても調べた。

【0067】具体的には、10μg/m1のシクロヘキシミドの存在又は非存在下で、TYS細胞を2時間、4時間又は8時間の各時間にわたりベスナリノン(50μg/m1)で処理し、得られたTYS細胞から細胞質RNAを調製し、1%複性アガロースゲルで電気泳動した(RNA: 20μg/レーン)，次いで、ナイロンフィルターに転写して、ヒトTSH-C-22、p21<sup>+/+</sup>及びβ-アクチン用の<sup>32</sup>P-標識プローブにハイブリダイズしてオートラジオグラフィーに供した。得られたオートラジオグラフをデンシティメトリック走査計で評価した。対照として、ベスナリノン未処理のTYS細胞についても同様に実験を行った。結果を図4に示す。

[10068] これからわかるように、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  のシクロヘキシミドの処理によって、おそらくは mRNA の蓄積に起因して、TSC-22 mRNA の発現は著しく増加したが、ベスナリノンによる TSC-22 遺伝子の誘導は抑制された（図 5, B）。一方、ベスナリノンによる P-21\*\*\* 遺伝子の誘導はシクロヘキシミドの処理によって阻害されなかった（図 5, C）。

100691 (4) 藤原

上記で示すように、TSC-22のmRNA発現は、数時間ペスナリノンで処理することによってわずかに増加したが、TSC-22 mRNAの選択的誘導はペスナリノンの処理後24時間で観察され、それは少なくとも3日間持続した。他方、TGF- $\beta$ 1処理では短時間でTSC-22 mRNAの選やかな誘導が観察された。また、Sibourouss、並びにJnm11及びJnm11らは、TGF- $\beta$ 1又はFSHによるマウス及びラット細胞のTSC-22の誘導は、Jun及びFosのように、急激ではあるが一時的なものであると報告している (J. Biol. Chem. 267:10219-10224 (1992); Endocrinology 134: 1205-1212 (1994))。また我々も、以前ペスナリノンがT-473細胞でTGF- $\beta$ 1タンパクの誘導を促進することを報告している (Cancer Lett. 113: 181-189 (1997))。

[10070]これらのことから、少なくとも本発明のヒトTYS細胞システムにおいて、ペスナリノンは、始めにその直接的な作用を介してTSC-22mRNAの発現を誘導し、その後TGF- $\beta$ 等の他のタンパクの產生を介して、TSC-22mRNAの発現を増強するよう働くと考えられる。

(0071) 2015 TSC-222サンバ23編集

(1) TYS細胞から調製した100μgのタンパクについてSDS-PAGEを行った。グルから該タンパクをニトロセルロースフィルター(BI-セル)に転写した。膜上のTSC-22タンパクをアフィニティ精製抗グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)-TS C-22融合蛋白ウサギポリクローナル抗体及びアマンダムECLキット(Amersham)を用いて検出した。結果を図6Aに示す。図からわかるように、20 kDa及び18 kDaの位置に2つのバンドが検出された。認移動

バンドはTSC-22タンパクのリン酸化フォームのようである。

【0072】(2)また、ベスナリノン処理によるTYS細胞中のTSC-22蛋白発現上昇を固相ELISAにより測定した。100μgのタンパクを96ウェルプレート(Falcon)に添加し、室温で3時間インキュベートした。第1抗体(アフィニティー精製抗GST-TSC-22融合蛋白ウサギ抗体;1:2000)をウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。リン酸緩衝液生理食塩水で洗浄後、HRP-コンジュゲート-ヒツジ抗ウサギIgG(Amersham, 1:500)をウェルに添加し、室温で1時間インキュベーションした。次いで、100μlのTMB(3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine, 0.1mg/ml; Sigma)溶液をウェルに加えて10分間インキュベートした。反応を1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>40

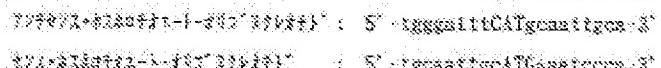
μl添加して停止し、450nmの吸光度を測定した。結果を図6Bに示す。

【0073】かかる固相ELISA法により、ベスナリノン処理によりTYS細胞中に発生されたTSC-22タンパク量は、未処理の細胞と比較して増加していることが示された。

【0074】実験例6、ヒトTSC-22mRNAに対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドの、ベスナリノン処理TYS細胞又は未処理TYS細胞への影響  
ヒトTSC-22mRNAに対するアンチセンス・ホスホリコエート-オリゴヌクレオチド(phosphorothioate oligonucleotide)およびセンス・ホスホリコエート-オリゴヌクレオチドを合成した(表3)。

#### 【0075】

【表3】



ベスナリノン処理TYS細胞及び未処理TYS細胞のそれぞれを、これらのオリゴヌクレオチドで処理して、細胞増殖に対する影響を調べた。具体的には、TYS細胞がコンフルエンスに達したとき若しくは細胞が急速に増殖した際に、直接培養細胞中にこれらのオリゴヌクレオチドを添加することによって細胞を処理した。細胞の数はMTTアッセイにより評価した。

【0076】結果を図7に示す。これからわかるように、TYS細胞を10μMのセンス・オリゴヌクレオチドで処理することにより、おそらくは高用量のオリゴヌクレオチドの非特異性細胞毒性に起因して、細胞の増殖がかすかに阻害された。しかしながら、等濃度のアンチセンス・オリゴヌクレオチドによる処理はTYS細胞の増殖を促進した(p<0.01)。さらに、アンチセンス・オリゴヌクレオチドはTYS細胞に対するベスナリノンの抗増殖作用を抑制した。ただし、この実験において、TYS細胞のベスナリノンによる処理は、細胞がコンフルエンスに達した時に開始したため、ベスナリノンのTYS細胞に対する抗増殖効果は図1に示される程強くなかった。

【0077】一方、TYS細胞を、低密度培養条件下(2×10<sup>3</sup>/ウェル)、ベスナリノンの存在若しくは非存在下で、アンチセンス・オリゴヌクレオチドで処理した場合、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの増殖効果を示すことはできなかった。図3に示すように、TYS細胞中のTSC-22mRNAの発現は、低密度培養条件下で非常に低かったが、細胞がコンフルエンスに達するまで徐々に増加し、このことからアンチセンス・オリゴヌクレオチドは低密度培養条件下で、TYS細胞中のTSC-22mRNAの発現を有効に阻害したと考えられる。

【0078】以上の実験から、次のように考察される。

【0079】TSC-22mRNAの発現レベルは、培養の細胞密度及び細胞サイクルによく相關した。TSC-22mRNAのレベルは増殖環境下では低かったが、細胞がコンフルエンスに達するとmRNAレベルは著しく増加した。ベスナリノンはTYS細胞中のTSC-22mRNAの発現を増加させ、G1相で細胞サイクルを停止することによって著しく細胞増殖を抑制した。またTSC-22mRNAに対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、細胞がコンフルエンスに達した後にTYS細胞の増殖を促進し、ベスナリノンの抗増殖効果を抑制した。これらのことから、TSC-22はTYS細胞株の成長・増殖をマイナスに制御し、TYS細胞においてベスナリノンからの増殖阻害シグナルを、少なくとも一部において、媒介していると思われる。

【0080】ヒトTSC-22タンパクのアミノ酸配列は、マウス及びラットの配列と98%一致した(1アミノ酸の挿入、1アミノ酸の置換)。このように種を越えて高い相合度でアミノ酸配列が保存されていることは、TSC-22が、細胞成長/増殖、分化及びアポトーシスといった細胞作用の制御に重要な果たしていることを示している。

【0081】Sakano、並びにNishizukaらは、ヒトTSC-22タンパクはまたロイシンジッパーメインのN末端の癌基因領域を介していていることを報告している(J.Biol.Chem.267:10219-10224(1992); Endocrinology 134: 1205-1212 (1994))。このことから、ヒトTSC-22は、CHOP(Genes Dev. 6:439-453 (1992))又はIP-1(Fell 64: 983-993 (1991))のように、癌基因のロイシンジッパー遺伝因子と相互作用し、ドミナントネガティブ制御因子として作用していると考えられる。CHOPは転写因子のC/EBPファミリーとホモジンがあり、GADD(Growth Arrest and DNA

A homolog) 1 ～ 3 としても知られており (Cell, Vol. 9: 4196-4203 (1990)), また C / EBP のドミナントネガティブインヒビターとして作用する (Genes Dev. 6: 439-453 (1992); Genes Dev. 6: 455-464 (1992))。該CHOP (GADD153) 遺伝子の発現は、成長抑制またはDNAダメージを引き起こす幾つかの試薬によって誘導される (Cell, Cell. Biol. 9: 4196-4203 (1990))。加えて、ドミナントレギュレーター Id はDNA結合領域を欠如したヘリックス-ループ-ヘリックス蛋白であり、細胞成長及び分化の制御についての研究が最もなされている (Cell 61: 49-59 (1990))。Id's (Id1, Id2, Id3 及び Id4) は特異的にヘリックス-ループ-ヘリックス蛋白 (MyoD, E2A, E12 及び E47) に結合し、DNA結合能力を阻害する (Nucleic Acids Research 22: 749-755 (1993))。Id's は前形成 (Cell 61: 49-59 (1990); J. Biol. Chem. 269: 6031-6039 (1994)), 神経形成 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 1355-1362 (1994)) 及び血漿形成 (Cell 79: 593-596 (1994)) 並びに細胞成長／増殖 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 4985-4989 (1994)) を含む幾つかの細胞システムにおける分化を制御する。

【0082】このようにTSC-22は、これらの分子と同様にドミナントネガティブ蛋白である可能性が高く、多くのロイシンジマー核苷酸の機能を遮断することによって種々の生物現象に影響を与えると考えられる。また、本発明のTSC-22誘導剤はその標的蛋白質が関与する疾患の治療・予防に有用である。

## 【0083】

## 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 24

配列の種類: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸・合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: primer

24

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸・合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: primer

25

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸・合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: primer

26

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸・合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: promoter

27

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸・合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: modified base

28

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸・合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: modified base

## 配列

ACCCAGCTTC CAGCTGGGCC TGGAG

配列番号: 2

配列の長さ: 25

配列の種類: 核酸

鎖の数: 一本鎖

## 配列

TCCTCGAGCTG CGCCTGAAAC TGCGC

配列番号: 3

配列の長さ: 20

配列の種類: 核酸

鎖の数: 一本鎖

## 配列

ATCTAGTTTG AACCAAGCTT

配列番号: 4

配列の長さ: 30

配列の種類: 核酸

鎖の数: 一本鎖

## 配列

TACGTCTACT GATTTATAAGG

配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の種類: 核酸

鎖の数: 一本鎖

## 配列

TGCAGATTCA TCCATATGCC

配列番号: 6

配列の長さ: 20

配列の種類: 核酸

鎖の数: 一本鎖

## 配列

## TECMATICA YAMADA

## 【図面の概要を説明】

【図1】TYS細胞のインビトロ増殖に対するベスナリノンの影響を示す図である。図はも回測定した平均値を示す。\*p<0.01 \*\*培地中のベスナリノンの濃度(μg/ml)。

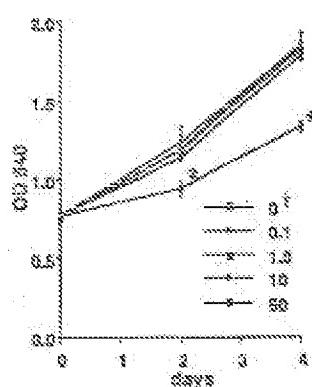
【図2】TYS細胞の細胞周期解析を示す図である。図中Aは、TYS細胞をベスナリノン非存在下で24時間、48時間及び72時間培養した結果を、また図中BはTYS細胞を50 μg/mlベスナリノン存在下で24時間、48時間及び72時間培養した結果を示す。

【図3】TYS細胞中のTSC-22のmRNA発現に対するベスナリノンの影響を示す図である。Aは、ベスナリノン(50 μg/ml)処理TYS細胞(+)又は未処理TYS細胞(-)から細胞質RNAを調製し、1%変性アガロースゲル上で分離し(mRNA:20 μg/レーン)、ナイロン膜に移して、ヒトTSC-22及びβ-アクチン用の32P-標識プローブにハイブリダイズした結果を示す図面に代わる写真である。Bは、Aで示すオートラジオグラフをデンシティメトリックスキャニングで測定した結果を示す。

【図4】TYS細胞中での、ベスナリノン及びTGF-β1によるTSC-22 mRNAの誘導の経時変化を示す図面である。Aは、図に示す時間(1, 2, 6, 12, 24時間)ベスナリノン又はTGF-β1で処理したTYS細胞から細胞質RNAを調製し、該RNA(20 μg/レーン)を1%変性アガロースゲル上で分離して、ナイロン膜に移し、次いでヒトTSC-22及びβ-アクチン用の32P-標識プローブにハイブリダイズした結果を示す図面に代わる写真である。Bは、Aで示すオートラジオグラフをデンシティメトリックスキャニングで測定した結果を示す。

【図5】TYS細胞中での、TSC-22及びp31<sup>++</sup>の誘導に対するシクロヘキシミドの影響を示す図で

【図1】



Vesnarinone  
Anti-sense  
Sense

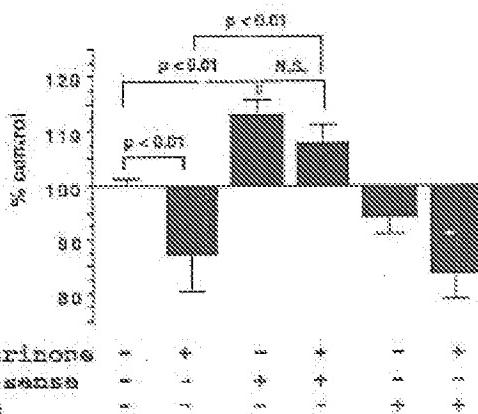
## 2

ある。Aは、10 μg/mlのシクロヘキシミドの存在又は非存在下で図に示す時間(2, 4, 6時間)ベスナリノン(50 μg/ml)で処理したTYS細胞(+)又は未処理のTYS細胞(-)から細胞質RNAを調製し、1%変性アガロースゲル上で分離し(mRNA:20 μg/レーン)、ナイロン膜に移して、ヒトTSC-22、p31<sup>++</sup>及びβ-アクチン用の32P-標識プローブにハイブリダイズした結果を示す図面に代わる写真である。Bは、Aで示すオートラジオグラフをデンシティメトリックスキャニングで測定した結果を示す。

【図6】Aは、TYS細胞中のTSC-22タンパクをウェスタンブロッティングによって検出した結果を示す図面に代わる写真である。TYS細胞に由来する100 kDaのタンパクサンブル(TYS)または精製粗挽えGST-TSC-22タンパク100 ng(GST-TSC-22)をSDS-PAGEに供し、ニトロセルロース膜に移し、アフィニティ精製抗-GST-TSC-22抗体で染色した。Bは、細胞中のTSC-22タンパクの座標をしELISA法による検出結果を示す。図中、コントロールは未処理TYS細胞から調製された100 kDaタンパク。DMSOは0.5%DMSOで48時間処理したTYS細胞から調製された100 kDaタンパク。Vesは50 μg/mlベスナリノンで48時間処理したTYS細胞から調製された100 kDaタンパクの結果をそれぞれ示す。線は、それぞれ2回測定した平均値を示す。図中の挿入図は抗原としてGST-TSC-22融合タンパクを用いた固相ELISA用のスタンダードカーブを示す。

【図7】ヒトTSC-22 mRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドにベスナリノン処理又は未処理TYS細胞に対する影響を示す図面である。数値は、6回試験した結果の平均を示す。

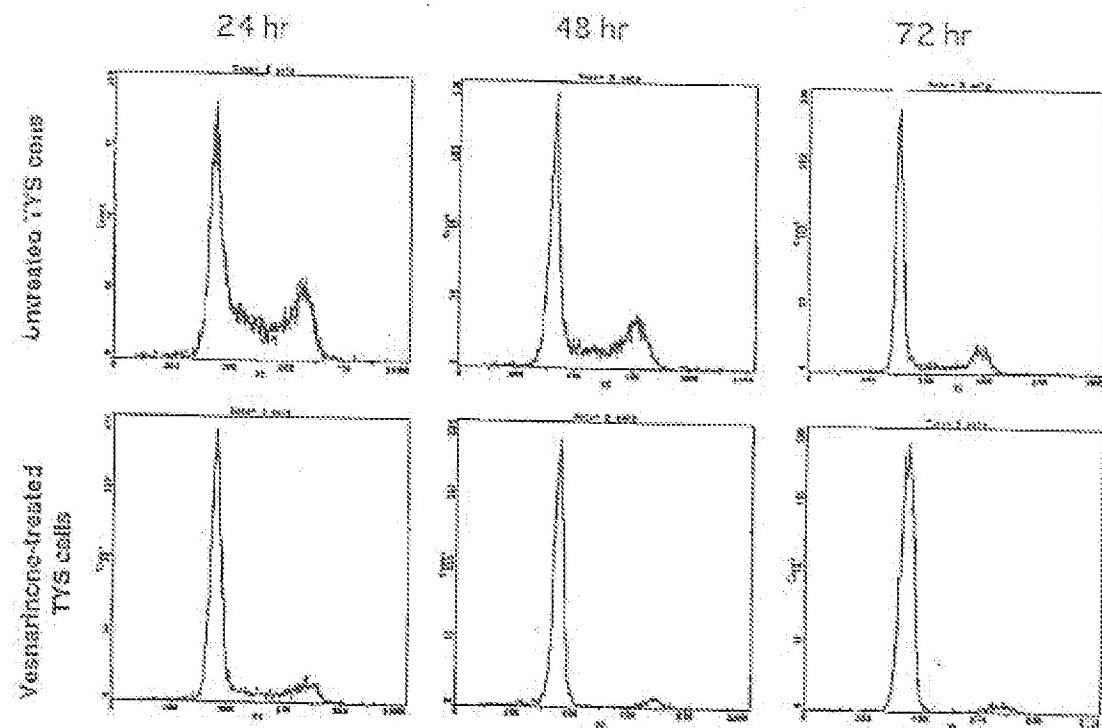
【図7】



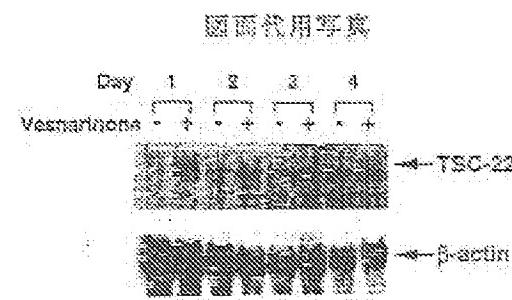
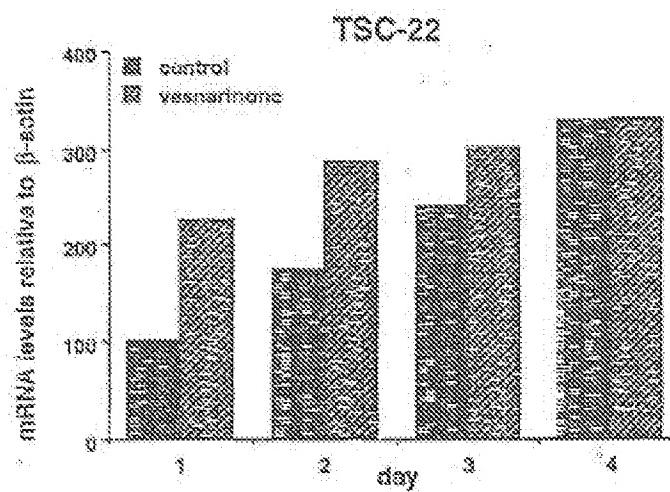
(1.2)

STIMULI - 4 5 12 2 2 3

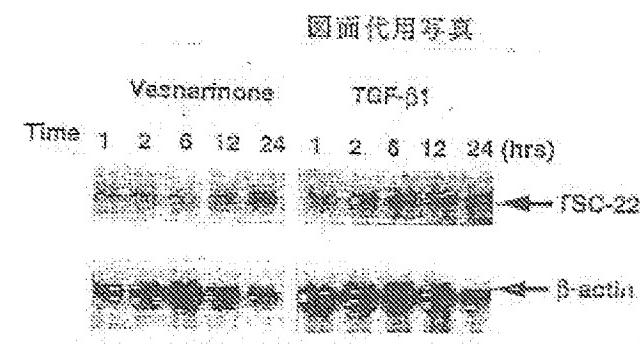
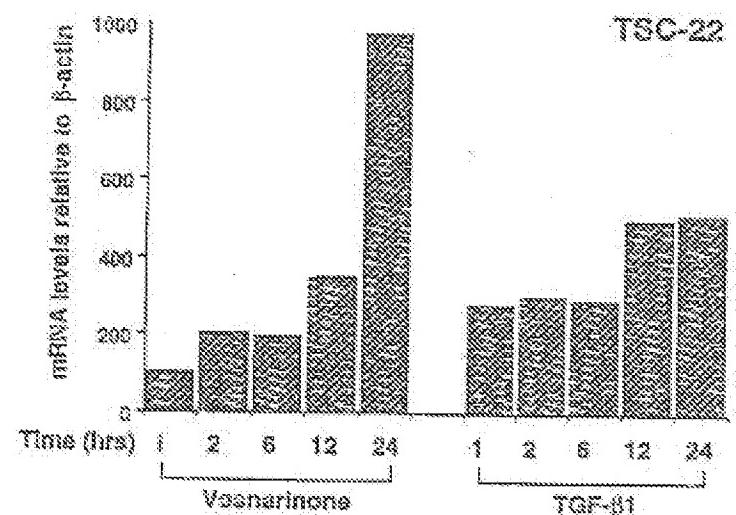
[■ 2]



【圖3】

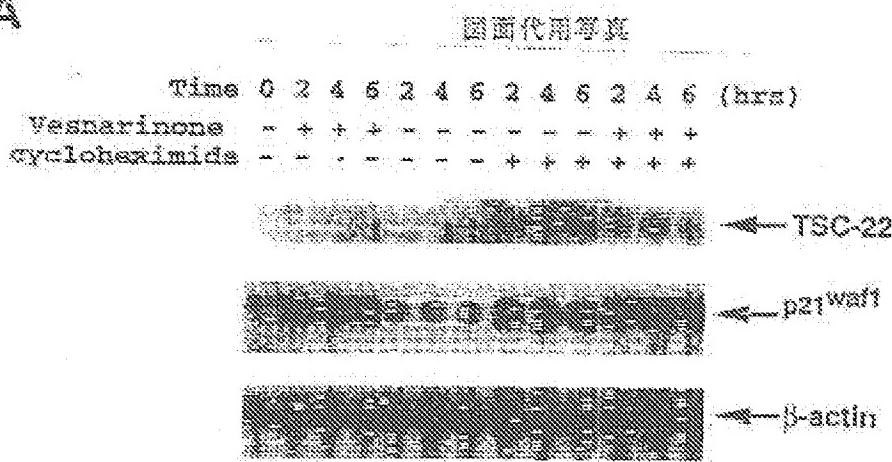
**A****B**

[圖4]

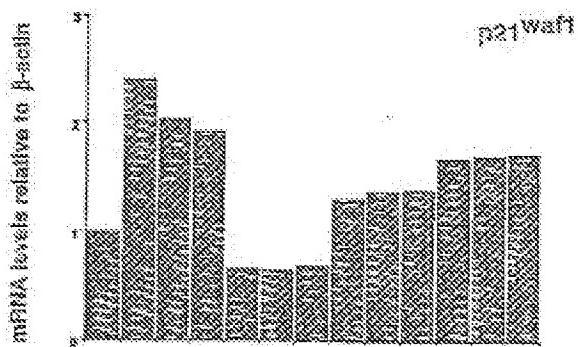
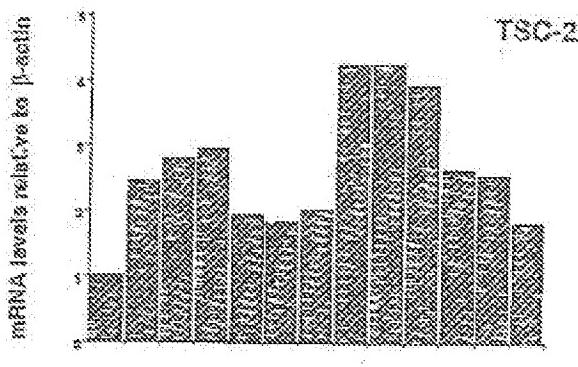
**A****B**

(図5)

A



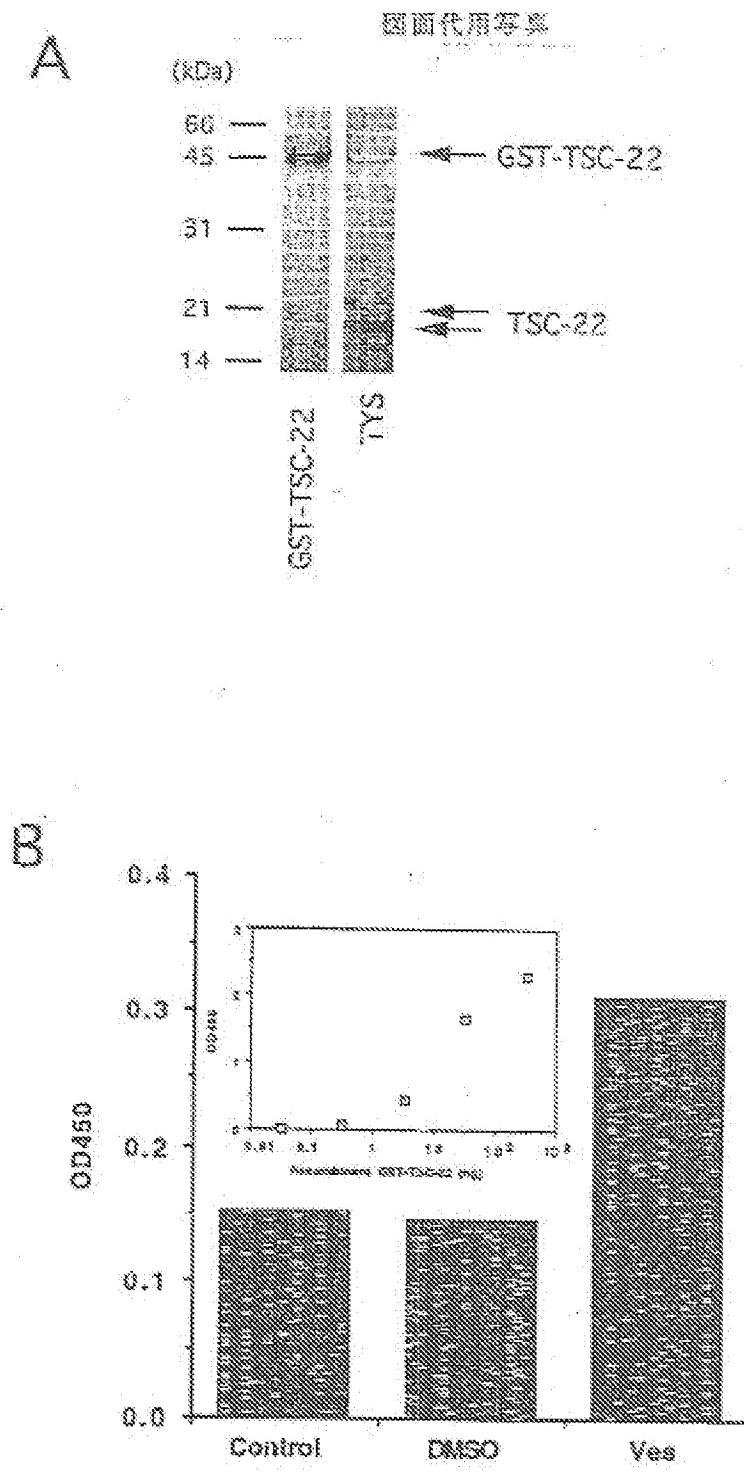
B



Time 0 2 4 6 2 4 6 2 4 6 (hrs)

Vesnarinone	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
cycloheximide	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

1886]



フロントページの続き

(S) Int. Cl. 6

// C 07 D 235/23

明細書

P. I

C 07 D 215/23